

学校编码: 10384

分类号_____ 密级_____

学号: 21620100153927

UDC_____

厦 门 大 学

博 士 学 位 论 文

**N,N'-二环己基-N-山嵛酸酰脲在小鼠同
种异体胰岛移植模型中的功能研究**

**Functional analyses of N-cyclohexyl-N-(cyclohexylcarbamoyl)
docosanamide in allogeneic islets transplantation in mice**

马鹏飞

指导教师姓名: 齐忠权 教授

专 业 名 称 : 生理学

论文提交日期: 2013 年 5 月

论文答辩日期: 2013 年 6 月

2013 年 5 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为（免疫抑制剂）课题（组）的科研成果，获得（齐忠权教授）课题（组）经费或实验室资助，在（厦门大学器官移植研究所）实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不做特别声明。）

声明人（签名）：

2013 年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国硕士、博士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其他方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于
年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ☒ ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）

2013 年 月 日

目 录

中文摘要.....	I
英文摘要.....	III
第一章 前言	1
1.1 糖尿病与胰岛移植	1
1.1.1 糖尿病概述.....	1
1.1.2 糖尿病并发症.....	1
1.1.3 糖尿病治疗方法.....	2
1.2 T 细胞与胰岛移植免疫排斥研究.....	3
1.2.1 T 细胞亚群和功能	4
1.2.2 胰岛移植排斥反应的类型和特点.....	6
1.3 T 细胞介导免疫排斥的机制.....	8
1.3.1 T 细胞对移植抗原的识别	9
1.3.2 T 细胞的激活	11
1.3.3 T 细胞的增殖	13
1.3.4 T 细胞对移植抗原的效应功能	14
1.4 T 细胞激活的信号通路概述.....	15
1.4.1 转录因子 NFAT 的研究.....	15
1.4.2 MAPK 信号通路	16
1.4.3 PI3K-AKT 信号通路.....	16
1.4.4 NF- κ B 信号通路	17
1.5 抑制 T 细胞诱导胰岛移植耐受.....	17
1.5.1 T 细胞与胰岛移植耐受	17
1.5.2 T 细胞免疫耐受建立的机制	18
1.5.3 胰岛移植中化学免疫抑制剂的应用.....	23
1.6 新型中药来源的免疫抑制剂的开发	28
1.6.1 雷公藤多苷.....	28
1.6.2 FTY-720	29

1.6.3	三氧化二砷 (Arsenic trioxide, As ₂ O ₃)	30
1.6.4	N,N'-二环己基-N-山嵛酸酰脲.....	30
1.7	本研究的目的、意义和内容	30
1.7.1	研究目的.....	30
1.7.2	研究意义.....	30
1.7.3	研究内容.....	31
第二章	材料与方法	32
2.1	实验材料	32
2.1.1	实验动物.....	32
2.1.2	主要试剂.....	32
2.1.3	主要仪器.....	35
2.2	研究方法	37
2.2.1	动物模型.....	37
2.2.2	细胞免疫学研究方法.....	39
2.2.3	分子生物学研究方法.....	44
2.2.4	统计学分析.....	51
第三章	结果与讨论	52
3.1	Cpd K 抑制 T 细胞的活化增殖及其作用机制	52
3.1.1	Cpd K 抑制 T 细胞增殖.....	52
3.1.2	CpdK 对 T 细胞凋亡的影响.....	55
3.1.3	Cpd K 对 T 细胞无能的影响.....	56
3.1.4	Cpd K 对 T 细胞激活信号通路的影响.....	56
3.1.5	小结.....	58
3.2	Cpd K 对胰岛毒性的研究	61
3.2.1.	Cpd K 对胰岛细胞凋亡的影响	61
3.2.2.	Cpd K 对胰岛素分泌的影响	62
3.2.3.	小结.....	63
3.3	Cpd K 联合 Rapa 延长同种异体胰岛移植物的生存期及其作用机制....	64
3.3.1	CpdK 联合 Rapa 延长同种异体胰岛移植物的生存期.....	64
3.3.2	CpdK 保护同种异体胰岛移植物的功能	65

3.3.3	Cpd K 保护同种异体胰岛移植物并减少炎症细胞浸润	66
3.3.4	Cpd K 可以降低受体对同种异体抗原的免疫应答能力	68
3.3.5	Cpd K 可能通过克隆清除保护同种异体胰岛移植物	70
3.3.6	Cpd K 通过诱导 Treg 细胞的表达保护同种异体胰岛移植物	71
3.3.7	小结	73
第四章	结论与展望	76
4.1	结论	76
4.2	展望	77
参 考 文 献	78
附 录	101
附录一：	图表索引	101
附录二：	缩略语及中英文对照	102
附录三：	攻读博士期间发表和待发表的学术论文	104
致 谢	105

Table of Contents

Chinese Abstract.....	I
English Abstract	III
Chapter 1 Introduction.....	1
1.1 Diabetes and islet transplantation	1
1.1.1 Diabetic Overview	1
1.1.2 Complications of diabetes.....	1
1.1.3 Diabetes treatments.....	2
1.2 T cells in islets transplantation	3
1.2.1 Subsets and function of T cells	4
1.2.2 Typers and characteristics of islet transplant rejection	6
1.3 The mechanisms of T cell mediated rejection.....	8
1.3.1 T cell transplantation antigen recognition.....	9
1.3.2 T cell activation.....	11
1.3.3 T cell proliferation	13
1.3.4 Immune response of T cell to alloantigen	14
1.4 T cells activated signaling pathway Overview.....	15
1.4.1 Introduction of transcription factor NFAT	15
1.4.2 MAPK signal pathway	16
1.4.3 PI3K-AKT signal pathway.....	16
1.4.4 NF- κ B signal pathway	17
1.5 Suppressing T cells to induce tolerance in islet transplantation.....	17
1.5.1 T cells and tolerance	17
1.5.2 T cell tolerance mechanism established.....	18
1.5.3 Application of immunosuppressant in islet transplantation.....	23
1.6 The development of novel traditional Chinese medicine (TCM) sources of immunosuppressants.....	28

1.6.1	Tripterygium Glycosides.....	28
1.6.2	FTY-720	29
1.6.3	Arsenic trioxide (As ₂ O ₃).....	30
1.6.4	N-cyclohexyl-N-(cyclohexylcarbonyl)docosanamide (Cpd K)	30
1.7	Purpose, significance and contents of this study	30
1.7.1	Purpose.....	30
1.7.2	Significance.....	30
1.7.3	Contents	31
Chapter 2	Materials and Methods	32
2.1	Materials	32
2.1.1	Animals	32
2.1.2	Main reagents.....	32
2.1.3	Main instruments	35
2.2	Methods.....	37
2.2.1	Animal transplantation models	37
2.2.2	Experiments of cell biology	39
2.2.3	Experiments of molecular biology.....	44
2.2.4	Statistical analysis	51
Chapter 3	Results and discussion	52
3.1	Cpd K suppressing T cells and induce islet transplant tolerance.....	52
3.1.1	Cpd K suppressing T cells proliferation	52
3.1.2	Analysis of T cell apoptosis after treatment with Cpd K.....	55
3.1.3	Analysis of T cell anergy after treatment with Cpd K	56
3.1.4	Analysis of T cell activation after treatment with Cpd K	56
3.1.5	Summary of this part.....	58
3.2	Toxicity of Cpd K to islets	61
3.2.1.	Analysis of islet cell apoptosis after treatment with Cpd K.....	61
3.2.2.	Analysis of insulin secretion after treatment with Cpd K.....	62
3.2.3.	Summary of this part.....	63
3.3	Mechanism of Cpd K combined with Rapa to prolong graft survival.....	64

3.3.1	Cpd K combined with Rapa prolong islet allograft survival.....	64
3.3.2	Cpd K protect the islet function	65
3.3.3	Cpd K protect islet allograft and reduce inflammatory cells infiltration	66
3.3.4	Cpd K reduce responder abilities of recipients mice	68
3.3.5	Cpd K protect islet allograft through clone depletion.....	70
3.3.6	Cpd K protect islet allograft through inducing Treg cell production.....	71
3.3.7	Summary of this part.....	73
Chapter 4	Conclusion and Prospect.....	76
4.1	Conclusion	76
4.2	Prospect.....	77
References	78
Appendices	101
Figure index	101
Abbreviations	102
My Publication	104
Acknowledgments	105

摘 要

目的：糖尿病及其并发症对人类健康的危害越来越大，给患者和社会造成了沉重的经济和精神负担。我国已成为世界上糖尿病发病率第二高的国家，目前临床上治疗糖尿病最有效的手段就是进行胰岛移植，但是移植术后的免疫排斥以及移植供体短缺等问题都严重阻碍了胰岛移植在临床上的进一步发展。移植术后的免疫排斥问题使胰岛的生存期不理想进而需要多次胰岛移植，这也进一步加剧了胰岛移植供体短缺的问题。此外，胰岛移植术后患者需要服用大量昂贵的免疫抑制剂，而且这些免疫抑制剂都存在较强的毒副作用，如 FK-506 具有很强的肾毒性而 Rapa 存在胰岛毒性，这不仅给患者带来了沉重的负担，同时也影响了胰岛的生存期以及移植患者的生活质量。目前，中药免疫抑制剂的开发已经取得很大的进展，雷公藤、FTY-720 等先后被研究证实具有良好的免疫抑制作用。Cpd K 是一种从中药板蓝根中提取的板蓝根组酸为前体化合物人工合成的高级不饱和脂肪酸，已经被证实具有免疫抑制的作用。本课题旨在研究 Cpd K 发挥免疫抑制作用的机制，并以小鼠同种异体胰岛移植为模型，研究 Cpd K 在胰岛移植中的作用及机制，以期获得一种免疫抑制效果更好、毒副作用更小、成本更低的免疫抑制剂，应用于临床胰岛移植。

方法：首先，我们通过淋巴细胞转化实验、凋亡实验等体外实验研究 Cpd K 对 T 细胞的抑制作用和机制，并通过检测胰岛细胞的凋亡以及胰岛素的分泌情况研究 Cpd K 对胰岛细胞是否有毒性作用；其次，我们建立小鼠同种异体胰岛移植模型，研究 Cpd K 单用或与 Rapa 联合使用对胰岛生存期的影响；最后，通过对 T 淋巴细胞亚群、Th1/Th2 相关炎症因子、供者特异性抗原引起的免疫应答能力、移植物病理切片等进行研究，试图阐明 Cpd K 抑制 T 细胞免疫应答和诱导胰岛移植耐受的机制以及作为免疫抑制药物的可行性。

结果：在体外实验中，首先我们通过淋巴细胞转化实验证实 60 μ g/ml~200 μ g/ml 的 Cpd K 可以显著抑制 T 细胞的增殖，并且具有剂量依赖性，100 μ g/ml 的 Cpd K 达到最佳的抑制效果；并且在淋巴细胞转化实验体系中加入外源的 IL-2 可以逆转 Cpd K 对 T 细胞增殖的抑制作用，说明 Cpd K 的作用机制

可能是诱导 T 细胞无能；其次，T 细胞凋亡实验表明 Cpd K 并不能诱导 T 细胞发生凋亡；再次，我们研究了 Cpd K 对 T 细胞激活信号通路的影响，并结合生物信息学对 Cpd K 作用靶点的筛选结果，证实它可以抑制转录因子 NF- κ B 和 AKT 激酶的活性，而这两者都受到同一个激酶—PI3K 的调控，因此我们推测 Cpd K 可能作用于 PI3K 这个激酶上。在体内实验中，Cpd K 联合半剂量 Rapa 可以抑制免疫排斥反应，并显著延长胰岛移植物的生存期，达到甚至超过全剂量 Rapa 的效果（有 15% 的受体鼠移植生存期 > 100 天甚至达到耐受）；我们通过对受体移植、血清以及脾脏和淋巴结中 T 细胞亚群的检测发现，Cpd K 联合半剂量 Rapa 可以显著降低受体鼠 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞的比例以及血清中 Th1/Th2 型细胞因子的浓度，同时移植中炎症细胞的浸润数量也相应减少，而且可以诱导调节性 T 细胞的产生。

结论：通过本课题的研究，我们首次证实了 Cpd K 在同种异体胰岛移植模型中可以通过诱导 T 细胞克隆无能并抑制 T 细胞的激活抑制了供体反应性 T 细胞介导的免疫排斥反应；Cpd K 与半剂量 Rapa 联合应用可以诱导调节性 T 细胞的产生，促进胰岛移植长期存活并耐受；此外，Cpd K 对胰岛的破坏作用较小，极有可能成为临床胰岛移植良好的免疫抑制剂。本研究作为临床前的基础研究，为 Cpd K 将来应用于临床提供了重要的理论依据。

关键词：胰岛移植耐受 Cpd K T 细胞无能 NF- κ B AKT

Abstract

Objective: Diabetes and its complications are becoming more damaging to human health, create heavy financial and emotional burden to patients and society. China has become the the second largest country all over the world in terms of the number of diabetics, and the most promising way to cure the diabetes is islet transplantation, while the problem of immune rejection after transplantation and donor shortage have become a stumbling block to the further development of islet transplantation in clinical. Immune rejection after transplantation has shorten the survival of islet grafts and makes patients require re-transplantation so that the present situation of the donor shortage is aggravated. In addition, patients need to take too many expensive immunosuppressants, but these immunosuppressants are also present to a strong toxic side effects, such as FK-506 has a strong nephrotoxicity and Rapamycin as islet toxicity, which not only to the patients brought a heavy burden, but also affected the islet grafts survival and quality of life of transplant patients. At present, the development of traditional Chinese medicine immunosuppressants has made great progress, triptolide and FTY-720 have been proved to possess excellent immunosuppressive effects. Cpd K is a kind of higher unsaturated fatty acids synthesized from "Banlangen-acid" which was extracted from the traditional Chinese medicine- *Isatis tinctoria* L., have been shown to have immunosuppressive property. The purpose of this project is to study how to play immunosuppressive effects of Cpd K, and the mice allogeneic islet transplantation model was employed to study the immunosuppressive effects of Cpd K in vivo. The ultimate purpose of this study is to obtain an immunosuppressive better, less side effects, lower cost of immunosuppressive agents used in clinical islet transplantation.

Methods: First, we researched the inhibitory effect and mechanism of Cpd K on T cell proliferation with lymphocyte transformation experiments and apoptosis experiments in vitro, and the toxic effect of Cpd K on islet through detecting islet

cells apoptosis and insulin secretion; Second, mice allogeneic islet transplantation model was established to research the effect after treatment with Cpd K alone or Cpd K in combination with sub-therapeutic dose of Rapa (sub Rapa) on islet grafts survival time. At last, through the ways such as the T-lymphocyte subsets, Th1/Th2 inflammatory factors, donor-specific antigen-induced immune response and graft pathological experiments, we try to clarify the mechanism of the inhibition of T cell immune response and induction of islet transplantation tolerance Cpd K as well as its feasibility of immunosuppressive drugs.

Results: In vitro, we found that 60 μ g/ml~100 μ g/ml Cpd K could significantly inhibit the proliferation of T cells proliferation in a dose-dependent manner, and 100 μ g/ml Cpd K could achieve the best inhibitory effect. And adding exogenous IL-2 into lymphocytes transforming experimental system, it could reverse the inhibition of Cpd K. It showed that Cpd K could induce T cells anergy. While apoptosis experiments in vitro showed Cpd K did not induce T cell apoptosis; Then we studied the impact of Cpd K on the signaling pathway of T cell activation, combined with the bioinformatics screening results of the Cpd K action targets we confirmed that it could inhibit the transcription factor NF- κ B and Akt kinase activity, both of which are regulated by a kinase-PI3K. Thus we speculated that the Cpd K might act on the PI3K kinase directly. In vivo experiments, the Cpd K in combination with sub-therapeutic dose of Rapa (sub Rapa) could suppress the immune rejection and significantly prolonged the survival time of islet grafts, even more than the effect of the full dose Rapa (There were 15% of the recipient mice that graft survival time > 100d even reach tolerance); From the experiments of detection of receptor graft, serum, spleen and lymph node T cells subsets, we found that the Cpd K in combination with sub Rapa could significantly reduce the proportion of CD4⁺ and CD8⁺ T cells, concentrations of Th1 / Th2 cytokines in serum and populations of inflammatory cells in graft, and induce the generation of regulatory T cells.

Conclusion: Through the research of this subject, as the first time, we confirmed that the Cpd K could suppress donor-reactive T cell-mediated immune rejection by

inducing T cell anergy and inhibiting the activation of T cells in the allogeneic islet transplantation model; Cpd K in combination with sub Rapa could induce the generation of regulatory T cells and promote long-term islet graft survival and tolerance. With a little destructive to the islets, Cpd K may become a immunosuppressive agent used in clinical islet transplantation. Our study, as preclinical basic research, provides an important theoretical basis for Cpd K future clinical application.

Keywords: islet transplantation tolerance, Cpd K, T cell anergy, NF- κ B, AKT

第一章 前言

糖尿病是当今威胁人类健康的三大疾病之一。国际糖尿病联合会最新资料显示，2011 年全球糖尿病患者高达 3.66 亿，每年的死亡人数高达 380 万。随着国民生活水平的日益提高，目前我国糖尿病的发病率呈逐年加速上升趋势。2010 年《新英格兰医学杂志》上多篇关于中国糖尿病大规模流行病学的研究显示，中国糖尿病患病率已达 9.7%，包含潜在患病率是 15.5%，已成为仅次于印度的世界第二糖尿病大国[1-3]。

1.1 糖尿病与胰岛移植

1.1.1 糖尿病概述

糖尿病是由遗传因素、不良饮食及生活习惯、精神因素等多种致病因子作用于机体导致胰岛功能减退、胰岛素抵抗等而引发的糖、蛋白质、脂肪、水和电解质等一系列代谢紊乱综合征。糖尿病主要包括 1 型和 2 型。1 型糖尿病为胰岛素依赖型，在总体糖尿病患者中占大约 10%。2 型糖尿病为非胰岛素依赖型，在总体糖尿病患者中占 90%。1 型糖尿病表现为胰岛细胞受损，胰岛素分泌素绝对不足，主要由于自身免疫细胞破坏胰岛细胞所致；2 型糖尿病发病原因包含更强的遗传和环境因素，并呈显著的异质性，胰岛素抵抗和胰岛素分泌不足并行存在，2 型糖尿病晚期，患者胰岛细胞被大量破坏，也会表现为胰岛素分泌绝对不足。

1.1.2 糖尿病并发症

1 型糖尿病是由于自身免疫性导致 β 细胞受损，常导致胰岛素绝对缺乏，所以需要依赖胰岛素治疗，又称胰岛素依赖性糖尿病 [4]。1 型糖尿病会引起微血管病变，临床上以糖尿病性视网膜病变、糖尿病性肾病、糖尿病性神经系统病变和糖尿病心血管疾病为主要表现[5-7]。

1.1.3 糖尿病治疗方法

目前临床用于治疗糖尿病的方法主要有胰岛素注射、胰腺移植和胰岛移植，接下来将对三种方法进行介绍。

1.1.3.1 胰岛素注射治疗

注射胰岛素是目前能控制 1 型糖尿病患者血糖的有效手段，但外源性胰岛素不能达到生理性调节血糖目的，增加发生低血糖的危险性和神经系统损害，不能制止糖尿病并发症的发生和发展，或早或晚会出现高血压、心衰、心梗、慢性肾功能衰竭、末梢神经坏死、视网膜脱离、足溃疡等严重并发症，严重威胁人类健康。

1.1.3.2 胰腺移植

同种胰腺移植可以纠正血糖代谢紊乱，但其外科技术复杂，容易导致胰痿等严重并发症，因此目前的胰腺移植仍限于终末期糖尿病性肾病需同时接受肾移植的病人。

1.1.3.3 胰岛移植

与胰岛素治疗相比，胰岛移植可以提供更为生理化的血糖控制，有效地避免胰岛素治疗中多发的神经性低血糖症，避免甚至逆转多种晚期并发症（如糖尿病肾病、眼病、肢端溃烂等）的发生。与胰腺移植相比，胰岛移植具有术式简单、术后并发症明显减少等优势。因此成功进行胰岛移植手术的 1 型糖尿病患者可基本脱离外源性胰岛素的应用，维持机体的正常代谢，避免并发症的发生，有望彻底治愈 1 型糖尿病。

胰岛移植具有很长的历史。在 Banting 和 Best 发现胰岛素之前，人们就已经认识到，胰腺的提取物可以缓解糖尿病。第一例原始的胰岛移植发生在 1894 年 [8]，英国医生 Watson Williams 和 Harsantin Bristol 把部分羊胰腺移植到一个患糖尿病酮症酸中毒的 15 岁男孩的皮下，移植物很快就被未接受任何免疫治疗的受体所排斥。第一例全胰腺移植是在 1966 年，由 Kelly 和 Lillehei 开展，但是效果非常可悲，术后 1 年移植物有功能的受体不足 3% 的，受体死亡率达到 60% [9]。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库